# Untersuchungen
## über die
# Sterine des Knollenblätterpilzes
## (Amanita phalloides)

---

# Ueber
# 3,12-Iso-Dioxy-cholensäure
## und
# 3,12-Dioxy-choladiensäure

---

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE NEUCHATEL
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

HENRI EGLI

---

NEUCHATEL
IMPRIMERIE PAUL ATTINGER S. A.
1940

# Untersuchungen
## über die
# Sterine des Knollenblätterpilzes
## (Amanita phalloides)

---

# Ueber
# 3,12-Iso-Dioxy-cholensäure
## und
# 3,12-Dioxy-choladiensäure

---

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE NEUCHATEL
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

HENRI EGLI

---

NEUCHATEL
IMPRIMERIE PAUL ATTINGER S. A.
1940

*La Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel, sur le rapport de MM. les professeurs M. de Montmollin, C. Boissonnas et H. Rivier, autorise l'impression de la présente thèse sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont contenues.*

*Neuchâtel, le 3 mai 1940.*

*Le doyen :*
*Edmond GUYOT.*



Die vorliegende Arbeit wurde im chemischen Laboratorium der Universität München ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer,

Herrn Geheimrat

HEINRICH WIELAND

möchte ich an dieser Stelle für die ausserordentlich freundliche Aufnahme in den Kreis seiner Schüler und für die wertvollen Anregungen die er mir stets zu teil hat werden lassen, meinen aufrichtigsten Dank aussprechen.

# INHALTSVERZEICHNIS


Untersuchungen über die Sterine des Knollenblätterpilzes (Amanita phalloides) . . . 5

EINLEITUNG . . . 5
Inhaltsstoffe der Pilze . . . 6
Die Sterine . . . 6

ERGEBNISSE . . . 8
Sog. Fungisterin . . . 8
Cerevisterin . . . 14
Cerebrin . . . 16
X-Körper . . . 17
Wachsalkohole . . . 18

EXPERIMENTELLER TEIL . . . 19

1. *Verarbeitung der Extrakte* . . . 19
Aetherextraktion vor der Verseifung . . . 19
Verseifung . . . 20
Chromatographie . . . 20

2. *Beschreibung der Versuche mit:*
Sog. Fungisterin . . . 22
Cerevisterin . . . 23
X-Körper . . . 24
Schrifttum . . . 26

Ueber 3,12-Iso-Dioxy-cholensäure und 3,12-Dioxy-chloladiensäure 27

Iso-Dioxy-cholensäure aus Apocholsäure . . . 28
Diensäure durch Bromierung der Iso-Dioxy-cholensäure . . . 29
Versuch die Diensäure mit Natrium zu hydrieren . . . 30
Oxydation der Iso-Dioxy-cholensäure . . . 30
Zusammenfassung . . . 31
Schrifttum . . . 32

# Untersuchungen
## über die
# Sterine des Knollenblätterpilzes
## (Amanita phalloides)

---

## EINLEITUNG

Im Laufe der Untersuchungen über die giftigen Prinzipien des Knollenblätterpilzes, die am chemischen Laboratorium der Universität München unternommen wurden, glaubt man auf Spuren von *Fungisterin* gestossen zu sein.[1]

*Fungisterin* ist 1908 beschrieben worden. Seitdem ist es, mit ganz wenigen Ausnahmen, in der Literatur nicht mehr erwähnt. Was wir über dieses Sterin wissen verdanken wir Tanret der es auch entdeckt hat.

Es ist merkwürdig wie wenig Interesse die Forschung für dieses Sterin übrig gehabt hat. Seine Bruttoformel ist noch nicht sicher gekannt, geschweige denn seine Konstitution geklärt. Es wäre auch sehr erwünscht die physikalischen und chemischen Eigenschaften, die Tanret beschrieben hat, einer Prüfung zu unterziehn, wenn man bedenkt wie leicht man es in der Sterin-Chemie, trotz scheinbarer Reinheit, mit Gemischen zu tun hat.

Es schien sich daher zu lohnen die nicht geringen Knollenblätterpilz-Aetherextrakte, die im Labor zur Verfügung standen, auf Sterine zu verarbeiten um dann unter diesen speziell nach *Fungisterin* zu fahnden. Man konnte erwarten dieses Sterin in genügender Menge und Reinheit zu erhalten um es auch eingehender untersuchen zu können.

Leider ging diese Erwartung nicht in Erfüllung. Dagegen bin ich auf ein dem *Fungisterin ähnliches Sterin* gestossen, das, seinen Eigenschaften nach, ein neues Individuum sein könnte. Ausserdem ist es mir geglückt, das ausserordentlich spärlich vorkommende und bisher nur von seinen Entdeckern erwähnte *Cerevisterin* wieder zu finden.

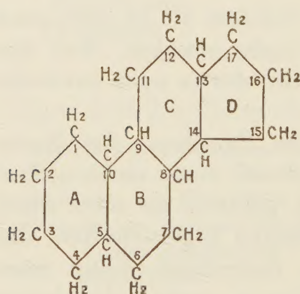
## Inhaltsstoffe der Pilze.[2]

Aus den Pilzen ist eine grosse Anzahl von Stoffen isoliert worden, die aber nur zum Teil identifiziert worden sind. 90 % des Pilzgewichtes besteht aus *Wasser*. Aus der getrockneten Pilzsubstanz kann man durch erschöpfende Extraktion mit 95 %igem Alkohol, bis zu ¼ des Gewichtes herauslösen. Als Rückstand verbleibt hauptsächlich *Pilzcellulose*. In den Extrakten findet man unter anderem : *Saccharide* (Mykose, Mannose, Glukose, Glukosan), *Alkohole* (Mannit, Wachsalkohole wie Cetylalkohol), flüssige und feste *Fettsäuren* (Essig-, Butter-, Oel-, Linol-, Palmitin-, Stearin-Säure), *Harzsäuren*, *cerebrinartige Stoffe*, *Sterine*, *Gerbstoffe*, *Cholin*.

## Die Sterine.

Die Sterine bilden eine Klasse von Naturstoffen, die die moderne Chemie schon weitgehend erschlossen hat.

Es sind *alicyklische*, *mehrkernige sekundäre Alkohole*, die sich vom **Cyclopentano-perhydrophenanthren** ableiten. Sie unterscheiden sich voneinander durch ihren Sättigungsgrad und durch den Aufbau der *aliphatischen Seitenkette*, die sie am *C-Atom 17* tragen. Sie sind in Wasser unlöslich, kristallisieren aber aus den gewöhnlichen organischen Lösungsmitteln in schönen Blättchen oder Nadeln. Ihre Lösungen sind optisch aktiv. Mit Essigsäureanhydrid und konz. Schwefelsäure geben sie charakteristische Liebermann-Burchard'sche Farbreaktionen. Mit *Digitonin* bilden sie meist schwerlösliche Anlagerungsverbindungen. Sie besitzen die Eigenschaft mit ihresgleichen und ähnlichen Stoffen schwer trennbare Mischkristalle zu bilden, was ihre Reindarstellung sehr erschwert.




Den Sterinen scheint eine grosse biologische Bedeutung zuzukommen, sind sie doch als primäre Bestandteile der lebenden

Zelle erkannt worden. Sie gehören zu den Inhaltsstoffen des tierischen-, pflanzlichen- und Pilz-Organismus.

Beachtenswert ist auch ihre strukturelle Verwandtschaft mit den *Gallensäuren*, den *Sexualhormonen*, dem *Hormon der Nebennierenrinde*, dem *Vitamin D*, den *Herzgiften* und den *neutralen Saponinen*.[3] Es liegt die Versuchung nahe, alle diese physiologisch so wichtigen Stoffe in eine genetische Beziehung zu bringen, obwohl wir über die Aufbauprinzipien, deren sich die Natur hierbei bedient, noch völlig im Dunkeln sind. Man weiss dass die Hefe mit Glukose oder anderen Kohlenhydraten als einziger Kohlenstoffquelle, Ergosterin zu synthetisieren vermag.[4] Andererseits hat man festgestellt, dass in der Hefe, wie auch im tierischen Körper der Steringehalt parallel mit dem Gesamtgehalt an Lipoiden ansteigt.[5] Man könnte daher vermuten, dass sich im biologischen Geschehen die Sterinbildung aus dem Kohlenhydrat-Fett-Stoffwechsel abzweigt.

Man unterscheidet Tier-, Pflanzen- und Pilzsterine. Diese Unterscheidung ist mehr als eine formale, denn die verschiedenen Sterine scheinen für ihre Gruppe charakteristisch zu sein. Im tierischen Organismus hat man z. B. noch keine Phytosterine gefunden; solche die mit der pflanzlichen Kost aufgenommen werden, werden vom Tiere überhaupt nicht resorbiert,[6] sie verlassen den Körper unverändert wieder.[7] Auf dieser Feststellung beruht die Annahme, dass Cholesterin im Organismus synthetisiert werden muss.

Von allen drei Sterin-Gruppen sind uns Vertreter bekannt, doch zeichnet sich in jeder Gruppe ein Sterin mengenmässig als Vertreter der Gruppe aus. Was *Cholesterin* $C_{27}H_{46}O$ für die Zoosterine und *Stigmasterin* $C_{29}H_{48}O$ für die Phytosterine sind, ist *Ergosterin* $C_{28}H_{44}O$ für die Mycosterine.

*Ergosterin* ist das bestuntersuchte Pilzsterin. Den Arbeiten von WINDAUS ist die vollständige Aufklärung seiner Konstitution zu verdanken. WINDAUS's zahlreichen und sinnvollen Untersuchungen war auch ein glänzender praktischer Erfolg beschieden, als es ihm gelang Ergosterin, durch Bestrahlung, in einen antirachitisch wirkenden Stoff zu verwandeln, der dem natürlichen Vitamin D äusserst nahe steht. Ergosterin wäre somit ein Provitamin. Ergosterin wurde 1889 von TANRET[8] im Mutterkorn entdeckt. Heute wird es technisch in grossen Mengen aus Hefe gewonnen.

Hefe ist überhaupt eine sehr ergiebige Sterinquelle. Aus ihr sind fast sämtliche Pilzsterine gewonnen worden, die wir heute kennen, nämlich: *Zymosterin*[9] $C_{27}H_{44}O$, *Kryptosterin*[10] $C_{30}H_{50}O$ und folgende, unter dem Namen Nebensterine der Hefe zusam-

mengefassten Sterine : *Ascosterin*, *Fäcosterin*, *Episterin*, *Anasterin*, *Hyposterin*, *Neosterin*,[11] deren Einheitlichkeit aber noch fraglich ist.
Zum Schluss erwähne ich noch *Fungisterin* und *Cerevisterin*, zwei Pilzsterine mit denen sich vorliegende Arbeit näher befasst hat.

---

# ERGEBNISSE

## Sog. Fungisterin

(ein neues Sterin?)

M. C. Tanret, der als Erster Ergosterin rein dargestellt hat, fand dass Ergosterin aus Mutterkorn $^1/_9$ eines neuen Prinzips enthält, das er *Fungisterin* nannte (1908).[12] Er charakterisiert es folgendermassen :

Sterin Sp. 144°-145° Drehung $(a)_D$ = — 22.4° ($CHCl_3$)
Acetat Sp. 159°-160° Drehung $(a)_D$ = — 15.9° ($CHCl_3$)
Summenformel : $C_{25}H_{40}O$

Kristallform : « ähnlich wie diejenige von Ergosterin, nur sind die monoklinen Blättchen (aus 95 %igem Alkohol) grösser und oft mit ihren längeren Seiten zu Gruppen verwachsen. »

« *Fungisterin* scheint noch oxydabler zu sein als Ergosterin. Besonders in Lösung, in der Hitze und am Licht gehen diese Sterine in amorphe, gefärbte Oxydationsprodukte über, die in Aether spielend löslich sind und die Kristallisation stark hemmen. »

In der Literatur wird *Fungisterin* noch von Zellner erwähnt der es im Laufe seiner umfangreichen Untersuchungen über die Inhaltsstoffe der höheren Pilze angetroffen hat.

Reindarstellung : Tanret hat Ergosterin und Fungisterin dank ihrer verschiedenen Löslichkeiten in Aether trennen können. Zellner hat diese Methode auch benutzt,[2] fand sie aber mit bedeutendem Materialverlust verbunden (Ergosterin erhielt er nach 10 Umkristallisationen rein, Fungisterin aber erst nach 30). Er versuchte daher das Windaus'sche Verfahren zur Trennung von Sitosterin und Stigmasterin anzuwenden.[13] Er acetylierte das Steringemisch ; die Acetate wurden bromiert und dann in 6 Fraktionen mit 75 %igem Alkohol gefällt. Jede Fraktion wurde reduziert und verseift. Das Endprodukt der ersten Fraktion schmolz bei 163°-165° und dasjenige der letzten bei 146°.

In meiner Aufarbeitung der Knollenblätterpilz-Aetherextrakte auf Sterine habe ich es versucht die chromatographische Methode anzuwenden, die schon in zahlreichen, bereits klassisch gewordenen Fällen glänzende Entmischungen ermöglicht hat.[14]

Die im folgenden beschriebenen Ergebnisse vorwegnehmend, bemerke ich gleich dass das Sterin, dem ich hier begegnet bin, mit dem Fungisterin von Tanret nicht identisch zu sein scheint ; deshalb soll es hier als *SOG. FUNGISTERIN* bezeichnet werden.

Wie im experimentellen Teil gesagt (s. S. 21), konnte ich aus Zone 3 ein Gemisch erhalten, das schon wesentlich mit *sog. Fungisterin* angereichert war. Der Schmelzpunkt lag zwischen 107° und 144°. Dieses Gemisch habe ich zahlreichen Umkristallisationen aus Methanol und Aceton unterworfen. Als niedrig schmelzende Komponente erhielt ich den *X-KÖRPER* Sp. 80°-81° (s. S. 17). Das *sog. Fungisterin* habe ich bis zum Sp. 154°-155° reinigen können, doch habe ich den Eindruck dass der Schmelzpunkt sich, durch weitere Umkristallisationen, um einige Grad erhöhen würde. Die weitere Reinigung habe ich aufgeben müssen, da mir das Material ausging. Bei dieser Gelegenheit möchte ich sagen dass auch diese Aufarbeitungsmethode und Reindarstellung nicht nur mühevoll, sondern auch mit bedeutendem Materialverlust verbunden sind. Zum Schluss verfügte ich nur noch über ca. 100 mg Substanz vom Sp. 154°-155° die knapp für die angestellten Versuche gereicht haben.

Liebermann-Burchard'sche Reaktion (L. B. R.) : In dieser Farbreaktion hat man ein vorzügliches Mittel um sog. Fungisterin im Reinigungsprozess zu verfolgen. Während bei Ergosterin das Farbenspiel in rascher Folge von rot über violett in hellgrün übergeht, schaltet sich beim *sog. Fungisterin* nach der violetten, eine ¼-½ Minute dauernde blaue Stufe ein, die dann allmählich über grünstichig in grün übergeht. Meines Wissens wird diese blaue Zwischenstufe nur noch von Cholesterin gegeben.[15]

Schmelzpunkt: Merkwürdigerweise bin ich im Laufe der Reinigung auf kein Sterin gestossen, das einen konstanten Schmelzpunkt von 144° aufgewiesen hätte. Je weiter ich reinigte, je mehr stieg dieser. Wie bereits gesagt, bin ich bis zum Sp. 154°-155° gekommen, ohne auf Konstanz gelangt zu sein. Dieser Schmelzpunkt könnte an unreines Ergosterin gemahnen. Dass es aber kein Ergosterin war, zeigten die Ultraviolettabsorption, die L. B. Farbreaktion und der Mischschmelzpunkt, der eine deutliche Depression aufwies.

Sehr charakteristisch ist auch die

Kristallisation: *Ergosterin* kristallisiert aus Methanol und Aceton in breiten, flachen Blättchen ; *sog. Fungisterin* dagegen in langen Nadeln, die Fühler-artig zusammenwachsen. Beide Sterine kristallisieren im monoklinen System.



*Tanret's Fungisterin* « kristallisiert in ähnlicher Weise wie Ergosterin, nur sind die Blättchen grösser und oft mit ihren längeren Seiten miteinander verwachsen ».

*Zellner's Fungisterin* « kristallisiert in ganz ähnlicher Weise wie Ergosterin, nur etwas weniger schön ».[2]
Meine Feststellung scheint mit diesen Angaben nicht gerade überein zu stimmen.

Bruttoformel : Die Formel $C_{25}H_{40}O$ ist von TANRET vorgeschlagen worden. An der Luft getrocknetes *Fungisterin* soll ein Molekül Kristallwasser enthalten.

| | | |
|---|---|---|
| Für $C_{25}H_{40}O.\ H_2O$ berechnet man | C = 79.31 % | H = 11.50 % |
| TANRET fand [12] | C = 80.00 % | H = 11.77 % |
| | 79.91 % | 11.70 % |
| ZELLNER fand [2] | C = 79.49 % | H = 11.77 % |

Bei 100° i. Hochv. getrocknetes *Fungisterin* soll wasserfrei sein.

| | | |
|---|---|---|
| Für $C_{25}H_{40}O$ berechnet man | C = 84.27 % | H = 11.23 % |
| TANRET fand [12] | C = 83.68 % | H = 10.99 % |
| | 83.64 % | 11.73 % |

Die Verbrennungsresultate die ich mit i. Hochv., das eine Mal bei 100°, das andere Mal bei 125° getrocknetem *sog. Fungisterin* erhalten habe, könnten mit der Formel $C_{25}H_{42}O$ in Einklang gebracht werden, wenn das Sterin noch ein halbes Molekül Kristallwasser enthalten würde.

| | | |
|---|---|---|
| Für $C_{25}H_{42}O.\ \frac{1}{2}\ H_2O$ berechnet man | C = 81.7 % | H = 11.8 % |
| gefunden habe ich | C = 81.65 % | H = 11.96 % |
| | 81.60 % | 11.93 % |

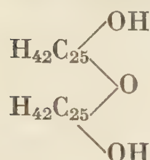
Mit der Formel $C_{25}H_{42}O$ würde noch das Verbrennungsergebnis des *Benzoates* ziemlich gut übereinstimmen :

| | | |
|---|---|---|
| Für $C_{25}H_{41}O.\ OC.\ C_6H_5$ berechnet man | C = 83.05 % | H = 10.45 % |
| gefunden habe ich | C = 83.05 % | H = 10.03 % |

*Sog. Fungisterin* würde, allem Anschein nach, sein Kristallwasser sehr stark festhalten. Selbst bis zur Sublimation getrocknet, würde es noch einen Teil seines Wassers gebunden halten.

Ausser dieser Auslegung des Verbrennungsergebnisses, die ja mit ihrem halben Molekül Wasser nicht besonders einnehmend ist, könnte

man das Vorhandensein einer A e t h e r v e r b i n d u n g annehmen, die aus 2 Sterinmolekülen hervorgegangen wäre. Für eine Summenformel von



berechnet man $C = 81.6\,\%$ $H = 11.8\,\%$
gefunden habe ich $C = 81.6\,\%$ $H = 11.9\,\%$

Das diesem Aether zugrunde liegende Sterin könnte die Summenformel $C_{25}H_{44}O_2$ besitzen und wäre ein zweiwertiger, gesättigter alicyklischer Alkohol. Diese Aetherhypothese ist aber auch nicht befriedigend. Die Analyse des Benzoates lässt sich mit ihr nicht in Einklang bringen, da diese 81.5 % C ergeben müsste. Ausserdem schmelzen die zweiwertigen Alkohole dieser Klasse gegen 200°. Eine Molekulargewichtsbestimmung könnte über den Wert dieser Hypothese entscheiden.

Doppelbindung : Die Formel $C_{25}H_{40}O$ (Tanret) setzt zwei, die Formel $C_{25}H_{42}O$ eine Doppelbindung voraus. Die Baeyer'sche- und die Tetranitromethan-Proben sind positiv verlaufen ; dagegen haben wiederholte Hydrierungen keine, einer Doppelbindung entsprechende Wasserstoffaufnahme ergeben (verunreinigendes Ergosterin wird an der geringen Wasserstoffaufnahme Schuld gewesen sein). Somit ist es wahrscheinlich, dass eine schwer hydrierbare Doppelbindung vorliegt.

Bromierung : Bei der Bromierung des *Benzoates des sog. Fungisterins* konnte ich ein interessantes F a r b e n s p i e l beobachten, das für dieses Sterin charakteristisch zu sein scheint. Nach Zugabe von Brom blieb die Lösung kurze Zeit farblos, wurde dann auf einmal gelb, dann intensiv gelb und schliesslich grün. Bei einem mit *Ergosterinbenzoat* angestellten Parallelversuch blieb dieses Farbenspiel aus. Dies scheint ein Zeichen von der Unstabilität des Bromierungsproduktes zu sein und könnte auf das Vorhandensein einer d i t e r t i ä r e n D o p p e l b i n d u n g hinweisen. Auch in diesem Punkte benimmt sich *sog. Fungisterin* ganz anders als *Fungisterin* ; ich erinnere dass Zellner sein Fungisterin gerade über das Bromid rein erhalten hat (s. S. 8).

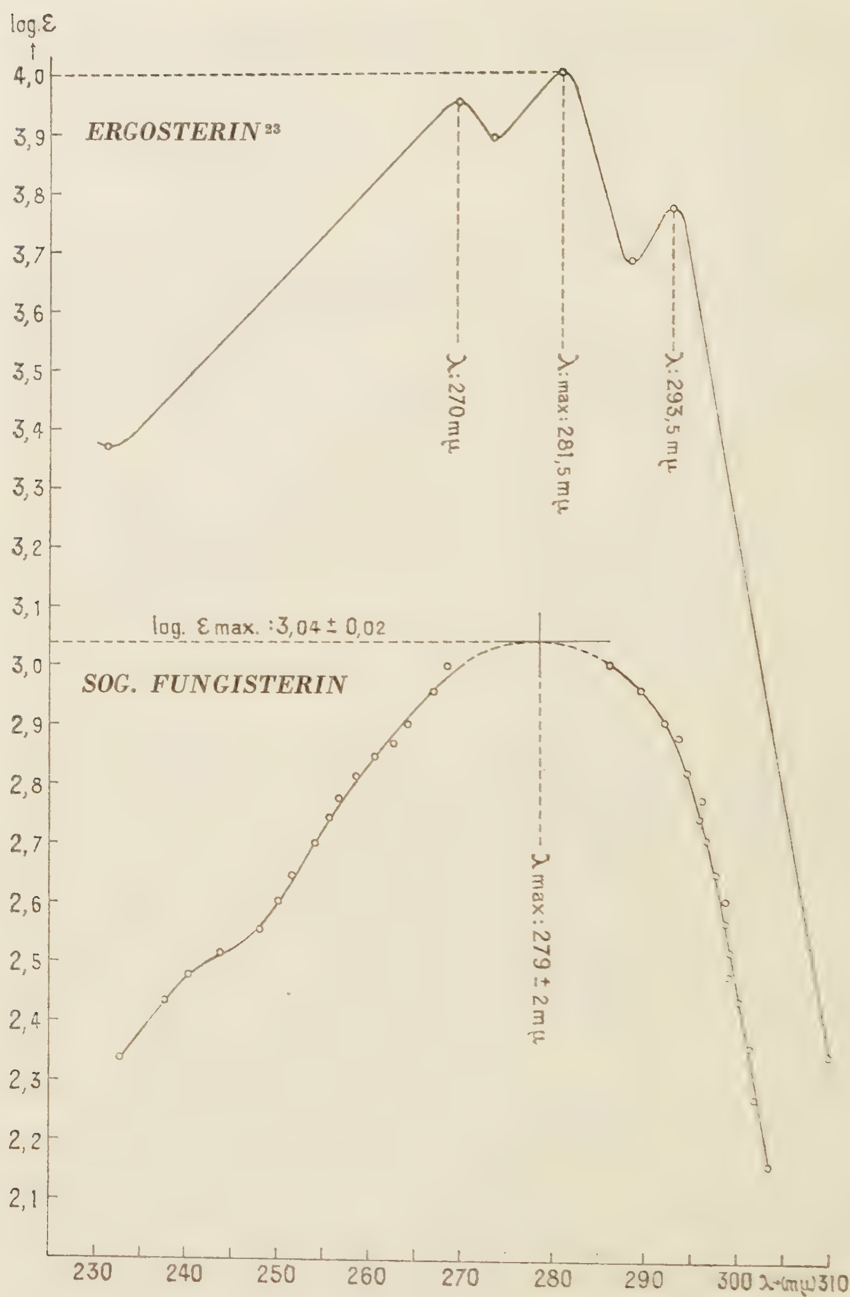
Benzoat : Das bereits erwähnte Benzoat schmolz bei 179.5°-180.5°.

Digitonid : *Sog. Fungisterin* bildet ein schwerlösliches Digitonid.

Lichtabsorption im Ultravioletten : Das ultraviolett-Absorptionsspektrum, das Fräulein Dr. Fr. Pruckner von der T. H. in München in liebenswürdiger Weise aufgenommen hat, zeigt :

1° dass *sog. Fungisterin* keine konjugierten Doppelbindungen hat,

2° dass meinem reinsten Produkte noch ca. 10 % Ergosterin beigemengt waren.


log.ε
4,0
3,9
3,8
3,7
3,6
3,5
3,4
3,3
3,2
3,1
3,0
2,9
2,8
2,7
2,6
2,5
2,4
2,3
2,2
2,1
ERGOSTERIN[23]
λ: 270 mμ
λ: max: 281,5 mμ
λ: 293,5 mμ
log. ε max. : 3,04 ± 0,02
SOG. FUNGISTERIN
λ max: 279 ± 2 mμ
230
240
250
260
270
280
290
300 λ-(mμ) 310

In der Tat deckt sich die gefundene Absorptionskurve mit der Kurve des reinen Ergosterins (vgl. Figuren). Beide Kurven nehmen bei ca. 230 m$\mu$ ihren Anstieg, erreichen bei ca. 280 m$\mu$ ihr Maximum und klingen gegen 300 m$\mu$ ab. Es ist eine Ergosterin-Kurve für die nur Ergosterin verantwortlich gemacht werden kann.
Ueber den Prozentgehalt meines Sterins an Ergosterin unterrichtet nun der gefundene Wert für log $\varepsilon_{max}$ = 3.04. Eine *100 °/₀ige Ergosterin-Lösung* ergibt log $\varepsilon_{max}$ = 4. Der Unterschied von rund einer Potenzeinheit im dekadischen Logarithmensystem besagt dass Ergosterin nur in 10 %iger Konzentration vorlag.

Drehung : Ich ermittelte eine Drehung von $(a)_D$ = — 24.8° aus Chloroform. (Für *Fungisterin* gibt TANRET $(a)_D$ = — 22.4° an.) Unter Berücksichtigung der 10 %igen Beimengung von Ergosterin, lässt sich der wahrscheinliche Drehwert für *sog. Fungisterin* auf $(a)_D$ = ca. — 13° errechnen.

## ZUSAMMENFASSUNG :

*Sog. Fungisterin* scheint mit dem *Fungisterin* von TANRET nicht identisch zu sein. Es könnte sich um ein neues Sterin handeln.

Seine Summenformel könnte $C_{25}H_{42}O$ sein.

Die einzige Doppelbindung, die durch Farbreaktionen angegeben wird, ist nicht hydrierbar.

Bei der Bromierung des *Benzoates* tritt eine charakteristische Farbenfolge ein.

Die L.B.R. zeigt eine deutliche blaue Stufe, die ¼-½ Minute dauert und von andern Pilzsterinen nicht gegeben wird.

Aus Methanol und Aceton kristallisiert das Sterin deutlich anders als Ergosterin.

Das reine Sterin dürfte um 1°-2° höher schmelzen als 154°-155°.

Das *Benzoat* schmilzt bei 179.5°-180.5°.

Die Drehung liegt zwischen : — 10° und — 13°.

## VORKOMMEN :

Ueber das mengenmässige Vorkommen von *Fungisterin* in den Pilzen ist nichts Sicheres zu erfahren. TANRET behauptet dass *Fungisterin* $^1/_9$ der Ergosterinmenge ausmacht. — Beim *sog. Fungisterin* ist das Verhältnis noch bedeutend ungünstiger ; ich schätze es auf 0.5 % - 1 % der Ergosterinmenge.

In den Aetherextrakten, die ich verarbeitet habe, habe ich kein Fungisterin gefunden. Es wäre wünschenswert einmal über bedeutenderes Ausgangsmaterial zu verfügen, um *Fungisterin* und *sog. Fungisterin* in genügender Menge darstellen zu können. — Ich frage

mich ob in den Aethermutterlaugen aus der technischen Ergosterindarstellung nicht das gegebene Ausgangsmaterial zu sehen wäre. Allerdings ist bis heute noch nicht berichtet worden, dass *Fungisterin* in der Hefe vorkommt ; sein Fehlen darin wäre aber sonderbar. Am Sichersten würde man vorgehen, wenn man das gleiche Ausgangsmaterial verwenden würde, wie TANRET, nämlich Mutterkorn-Aetherextrakte. Da dieser Pilz technisch in grossen Mengen verarbeitet wird, dürften diese Extrakte nicht allzu schwer in genügender Menge erhältlich sein.

## Cerevisterin.

*Cerevisterin* ist ein von E. M. HONEYWELL und C. E. BILLS im Jahre 1932 in der Hefe entdecktes Sterin.[16] Es gelang diesen Forschern aus 4500 Kg getrocknetem Saccharomyces cerevisiae 10 gr davon rein zu erhalten. Es ist das höchstschmelzende Sterin das man heute kennt. Es wird wie folgt beschrieben :

| | | |
|---|---|---|
| Sterin | Sp. 247-250°, korr. 265.3° | Drehung $(a)^{25°}_{5461} = — 57.4°$ |
| Diacetat | Sp. 170.5° | Drehung $(a)^{25°}_{5461} = — 162.9°$ |
| Zwei Doppelbindungen ?) | | Schwache Absorption bei 248 m$\mu$ |
| Zwei OH — Gruppen | | Bildet kein schwerlösliches Digitonid. |
| Bruttoformel : $C_{28}H_{46}O_3$ | | |

Kristallform : Aus Alkohol langgestreckte, aus Essigester breite, hexagonale Prismen.

Darstellung : *Cerevisterin* wird aus den Mutter-Laugen erhalten, aus denen man das Roh-Ergosterin gewonnen hat. Trotz seiner bemerkenswerten Schwerlöslichkeit in allen organischen Lösungsmitteln, verzögern die geringsten Sterinspuren seine Kristallisation wesentlich. Hier haben wir ein typisches Beispiel, wie die Anwesenheit von Verunreinigungen die Löslichkeit eines Stoffes von Grund aus ändern kann.

Ohne zur Chromatographie zu greifen, kann man aus den M. L., die möglichst von *Ergosterin* und *Zymosterin* befreit wurden, einen amorphen, weissen Niederschlag erhalten, wenn man diese M. L. längere Zeit im Eisschrank mit Hexan digeriert. Durch zahlreiche Kristallisationen aus Alkohol : Aceton 1 : 3 erhält man schliesslich reines *Cerevisterin.*

Wie im experimentellen Teil (s. S. 21) gesagt, fand ich bei der Chromatographie *Cerevisterin* im obersten Teil der Säule. Mit seinen drei Sauerstoffatomen ist es der Stoff, der vom Aluminium-

oxyd am stärksten adsorbiert wird. Seine Elution mit Aether ist lang, viel rascher gestaltet sie sich bei Anwendung von Methanol.

Es ist auffallend dass *Cerevisterin* in der Literatur, seit den Veröffentlichungen von Honeywell und Bills, nicht mehr erwähnt wird. Der Grund wird in seinem verschwindend kleinen Vorkommen in den Pilzen zu suchen sein. Im hiesigen Laboratorium z. B., wo schon beträchtliche Mengen Hefe-M. L. auf Sterine und Nebensterine verarbeitet wurden, ist man diesem Sterin nicht begegnet. An der Richtigkeit des Tatbefundes der amerikanischen Forscher hat man nicht gezweifelt ; man ist eher geneigt zu glauben, dass sich die europäische Heferasse von der amerikanischen vielleicht in dieser Beziehung differenzieren könnte.

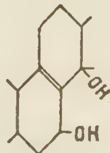
Dank der chromatographischen Methode ist es mir gelungen aus dem — an den von H. u. B. verarbeiteten Hefemengen gemessen — bescheidenen Material, das mir zur Verfügung stand, ca. 50 mg reines *Cerevisterin* zu erhalten. Diese Menge hat aber knapp für die angestellten Versuche gereicht.

Identität meines Produktes mit Cerevisterin : Ein Vergleich meines Produktes mit *CEREVISTERIN*, das mir Herr Bills in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt hat, ergab einwandfrei dass es derselbe Stoff ist. Farbreaktionen und Schmelzpunkte waren identisch, ein Mischschmelzpunkt gab keine Depression.

Doppelbindungen : H. u. B. glauben zwei konjugierte Doppelbindungen annehmen zu können und zwar auf Grund einer, allerdings sehr schwachen Absorption im Ultraviolettspektrum, deren Maximum bei ca. 248 m$\mu$ liegt. Die Rosenheim'sche Reaktion verläuft auch positiv.

Meine Benzopersäuretitration lässt auf eine Doppelbindung schliessen. Dagegen wurde bei der Hydrierung kein Wasserstoff aufgenommen und die Baeyer'sche- und die Tetranitromethanproben verliefen negativ.

Nun sind aber D. B. zwischen zwei tertiären C-Atomen nicht hydrierbar ; anderseits fällt die Rosenheim'sche Reaktion nicht nur bei konjugierten D. B., sondern auch bei $\alpha\beta$-ungesättigten Alkoholen positiv aus.[17] Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen könnte im *Cerevisterin* folgende Anordnung gegeben sein :




*Cerevisterin* ist ein überaus interessantes Glied in der Reihe der Sterine und wäre wert eingehender studiert zu werden. Sterine sind grösstenteils einwertige Alkohole. Es sind aber Sterine oder sterinähn-

liche Stoffe bekannt, die 2 O-Atome enthalten, wie : *Onocerol*,[18] *Casimirol*,[19] *Arnisterol*[20] und *Faradiol*.[21] Alle schmelzen infolge ihres grösseren O-Gehaltes gegen 200°. Sterine mit 3 O-Atomen sind, ausser Cerevisterin, nicht bekannt.

Funktion des Sauerstoffs im Cerevisterin : Zwei O-Atome liegen als -OH Gruppen vor *(Diacetat)*. Ueber die Natur des dritten O-Atoms kann noch nichts gesagt werden. Auf Grund ihrer gewissenhaften Untersuchungen schliessen H. u. B. folgende Sauerstoffunktionen aus : Aldehyd, Keton, Methoxyl, Aethoxyl, Carboxyl, Lacton oder Oxysäure. Es bliebe noch die Vermutung auszusprechen, dass das dritte O-Atom als tertiäres -OH vorliegen könnte, das bekanntlich sehr schwer veresterbar ist. In dieser Richtung unternommene Versuche führten aber H. u. B. zu keinem Resultat, da *Cerevisterin*, unter den Bedingungen, wie man sie bei Reaktionen auf tertiäre Alkohole anwendet, nicht stabil ist.

### Zusammenfassung :

Doppelbindungen werden im *Cerevisterin* durch Permanganat und Tetranitromethan nicht angezeigt.

Die Hydrierung ist negativ ausgefallen.

Die Persäuretitration zeigt eine D. B. an, die wahrscheinlich ditertiär ist.

Der positive Ausfall der Rosenheim'schen Reaktion dürfte daherkommen, dass die D. B. zu einer OH-Gruppe $\alpha\beta$-ständig ist.

Die von H. u. B. festgestellte sehr schwache Lichtabsorption im Wellenbereiche von 248 m$\mu$ könnte durch geringe *Ergosterin-Beimengungen* verursacht sein.

## Cerebrin.

Ich erhielt 0.77 gr einer weissen, kompakten Kristallmasse, die in den gewöhnlichen Lösungsmitteln ausserordentlich schwer löslich ist. Aus Benzol scheidet sie sich beim Abkühlen in Form einer steifen Gallerte.

Sp. 138°-139° Keine L. B. R. 2.11 % Stickstoff.
(3.459 mg Substanz gaben 0.067 ccm $N_2$ bei 23° und 718 mm Hg.)

Nachdem ich diese Substanz als *Cerebrin* erkannt hatte, habe ich auf ihre Weiterverarbeitung verzichtet.

*Cerebrin* bildet aus Aethanol farblose, zu Büscheln vereinigte Nadeln.
Sp. 143°-144° . Aktiver Wasserstoff : 0.732
Bruttoformel : $C_{42}H_{85}NO_5$ N = 2.04 %

Durch saure Hydrolyse konnte Fr. REINDEL[22] *Cerebrin* in eine *N-freie Säure* und eine *basische Komponente* spalten. Die Säure hat er isolieren können und spricht sie als *α-oxy-Hexacosansäure* an. $C_{26}H_{52}O_3$ Sp. 103.5°-105°.

JUL. ZELLNER[2] schreibt dem *Cerebrin* einen Cerebrosid-charakter zu. Von den eigentlichen Cerebrosiden würde es sich aber dadurch unterscheiden, dass es im nativen Zustand keine Zuckerkomponente besitzt.

*Cerebrin* ist ein Begleitkörper des Ergosterins. Es verzögert dessen Kristallisation aus einer aetherischen Lösung. Cerebrinhaltiges Ergosterin löst sich in organischen Lösungsmitteln nicht klar auf. Bei längerem Stehen einer aetherischen Lösung setzt sich das Cerebrin, infolge seiner Schwerlöslichkeit in Aether, allmählich als amorpher Bodensatz ab. Man erhält es dementsprechend aus dem schleimigen Niederschlag der sich in den Pilz-Aetherextrakten bildet (s. S. 19 (A)). Bei der Verseifung wird Cerebrin gespalten und kann daher nicht mehr im nativen Zustand gefunden werden.

## X - Körper.

Dieser Körper war meinem *Sog. Fungisterin* beigemengt und wurde bei der Umkristallisation desselben aus Aceton als schwerlöslicher Teil erhalten.

Die Analysenwerte, die Molekulargewichtsbestimmung und der Schmelzpunkt würden auf eine *Fettsäure* hinweisen, und zwar könnte man den Körper, an Hand folgender Vergleiche, als *Tetracosan-* oder *Pentacosan-Säure* ansprechen :

| | *Formel* | *M* | *C* | *H* | *Sp.* |
|---|---|---|---|---|---|
| *X-Körper* | | 385 | 78.11 % | 13.34 % | 81°-82° |
| *Tetracosansäure* | $C_{24}H_{48}O_2$ | 368 | 78.18 % | 13.13 % | 84° |
| *Pentacosansäure* | $C_{25}H_{50}O_2$ | 382 | 78.45 % | 13.18 % | 82°-83° |

Nun sprechen aber zwei Tatsachen gegen den Säurecharakter dieses Körpers, nämlich :

*a)* der negativ ausgefallene Versuch auf Säurecharakter,

*b)* die Tatsache, dass er im Aetherauszug des Unverseiften gefunden wurde.

Allerdings ist mit der Möglichkeit zu rechnen dass es, bei der ausserordentlich milden Verseifung (es wurde bei Zimmertemperatur verseift), mit dieser Säure zu keiner Verseifung gekommen wäre, in welchem Falle die freie Säure vom Aether aufgenommen wäre. Der negativ ausgefallene Versuch (a) würde dann nicht unter günstigen Bedingungen

vorgenommen worden sein und besagen, dass die Salzbildung mit dieser Säure recht träge ist.

Einen Körper nichtsaurer Natur der Formel $C_{24}H_{48}O_2$ könnte man sich als Reduktionsprodukt der *Cerebronsäure:* $CH_3(CH_2)_{21}CHOH.COOH$ denken, und zwar vielleicht als *Aldehyd. Cerebronsäure* ist bekanntlich ein Baustein der Cerebroside, die man als Begleiter des Cholesterins in der Hirnsubstanz findet. Es liegt nahe anzunehmen dass auch Pilzsterine von solchen N-haltigen Stoffen begleitet sein könnten. Zellner hat dem *Cerebrin* diese Rolle zugeteilt, was er auch in der Namengebung ausgedrückt hat.[2] Fr. Reindel[22] hat als sauren Bestandteil des Cerebrins eine *α-oxy-Hexacosansäure* $C_{26}H_{52}O_3$ Sp. 103.5°-105° isoliert. Es ist aber gar nicht ausgeschlossen dass auch *Cerebronsäure* und ihre Derivate in der Pilzsubstanz enthalten sind.

Leider konnte ich, wegen zu geringer Substanzmenge, meine Untersuchungen nicht weiter führen.

## Wachsalkohole.

Bei der Chromatographie findet man die *Wachsalkohole* in den Benzoldurchläufen. Sie gehören zu den Stoffen die von Aluminiumoxyd am schwächsten adsorbiert werden; beim Entwickeln mit reinem Benzol werden sie daher als erste aus der Säule eluiert.

Die Roh-Alkohole habe ich an der Wasserstrahlpumpe unter 20 mm Hg. destilliert. Sie gingen zwischen 260° und 270° über. Das Destillat habe ich dann in Aether gelöst und mit Methanol fraktioniert gefällt. Ich erhielt zwei Fällungen:

1. weisse, glänzende Schuppen Sp. 53°-55°
2. kleine, weisse Schüppchen Sp. 48°-50°

Verbrennungen habe ich keine vorgenommen.

(1.) scheint *Heptadecylalkohol* $C_{17}H_{36}O$ Sp. 54°-56° und
(2.) scheint *Cetylalkohol* $C_{16}H_{34}O$ Sp. 48°-50° zu sein.

# EXPERIMENTELLER TEIL

## 1. Verarbeitung der Extrakte.

Zur Verarbeitung kamen Aetherextrakte aus:

1. 4 Kg
2. 9.3 Kg

} trockenen Knollenblätterpilzen.

Von diesen Partieen scheint die zweite am schonendsten erhalten worden zu sein. Während (1) zähe, schwarzbraune Schmieren darstellten, war (2) eine olivgrüne, süsslich riechende, ölige Flüssigkeit, in der eine mit Kristallen durchsetzte, schleimige Phase zu erkennen war. (Partie 2 wog 350 gr was einer Extraktion von 3.7 % der Trockensubstanz entspricht.)

Das Ausgangsmaterial wurde zuerst scharf zentrifugiert. Ich erhielt einen schleimigen Niederschlag (A) und eine flüssige Phase (B).

Aetherextraktion : (A) wurde eine Woche lang am Rückflusskühler mit Aether extrahiert. Die Vorlagen habe ich anfangs öfters gewechselt. Zuerst gingen die *Sterine* über, und zwar quantitativ. Am dritten Tag schien die Extraktion unwirksam geworden zu sein. Am vierten Tag fing *Cerebrin* an durchzulaufen ; infolge seiner schweren Löslichkeit in Aether setzte es sich in einer kompakten Kristallmasse an den Kolbenboden an.

Aus den Aethervorlagen wurden die Kristalle abgenutscht und mit kaltem Aether gewaschen. Die Extrakte der ersten drei Tage enthielten kein *Cerebrin*, die nächstfolgenden Extrakte dagegen keine *Sterine* mehr. — Nach Einengen der M. L. konnte eine zweite Kristallisation erhalten werden. — Dann wurde der Aether abgedampft und der Rückstand bis zu klarer Lösung mit heissem Methanol versetzt. Der erhaltene Niederschlag wurde wieder aus Aether umkristallisiert. — Aus dieser Extraktion erhielt ich :

*Roh-Ergosterin* Sp. 147°-157°, *Roh-Cerebrin* Sp. 138°-139° und die entsprechenden M. L. die mit (B) der Verseifung unterzogen wurden.

Verseifung : (B) wurde mit 20 %iger methylalkoholischer Kalilauge verseift. Da Grund zur Annahme vorliegt, dass die *Sterine* durch heisse Alkalien angegriffen werden, wurde die Verseifung bei Zimmertemperatur vorgenommen (Stehenlassen über Nacht). Es ist zu empfehlen nur die Menge zu verseifen, die man sich auch sofort weiter zu verarbeiten vornimmt ; ich habe die Erfahrung gemacht dass ein längeres Verweilen des Unverseiften in alkalischem Medium der Sterinausbeute Eintrag tut.

Es folgte die

Trennung des Unverseiften : Direktes Extrahieren mit Aether führt zu keinem Resultat; es bildet sich eine unentmischbare Emulsion. Eine glatte Phasentrennung erzielt man durch Zugabe von Wasser. Bekanntlich sind die Seifen in einem Wasser-Alkohol-Gemisch leichter löslich als in jedem dieser Lösungsmittel allein angewandt. Nach einem Verdünnen der Verseifungslauge mit ca. dem dreifachen Volumen Wasser, habe ich mit Aether erschöpfend ausgeschüttelt. Wenn man das erste Mal mit $^2/_3$ Volumenteilen und dann noch zweimal mit je $^1/_4$ Volumenteilen Aether ausschüttelt, ist die Extraktion des Unverseiften praktisch vollzogen. — Die Aetherextrakte wurden mit Natriumsulfat über Nacht getrocknet, der Aether dann zum grössten Teil abdestilliert und die eingeengte Lösung stehen gelassen. Es kristallisierte aus ihr *Ergosterin* in feinen Nadeln Sp. 153°-157°. — Die M. L. wurden vom Aether befreit und in Benzol gelöst. Diese Benzollösung wurde dann der Chromatographie unterzogen.

Chromatographie : Die chromatographische Adsorption erfolgte an einer Aluminiumoxyd-Säule, deren Dimensionen ich durch einen schnell gemachten Vorversuch ermittelt habe. Ich habe darauf geachtet dass die unterste, stark gefärbte Zone (3), nach dem Entwickeln, noch in der Säule blieb. — Die Benzollösung wurde durch die mit Benzol angefeuchtete Säule geschickt. Als die ganze Lösung durchgeflossen war habe ich mit dem gleichen Volumen reines Benzol entwickelt. — In der Säule hatten sich ziemlich scharf getrennte Zonen gebildet, die, von oben nach unten, wie folgt aussahen :

Zone 1 : orange-gelb mit gelber Fluoreszenz
Zone 2 : citronengelb ohne Fluoreszenz
Zone 3 : dunkelbraun » » ; die unterste
Zone 4 : war farblos, doch konnte man an ihrer Berührungsstelle mit Zone (3) unter der Uviollampe intensive Fluoreszenzringe wahrnehmen, die, von oben nach unten, hellgrün, weiss, himmelblau und blaulila fluoreszierten.

Die Säule wurde hierauf abgebaut und jede Zone für sich zuerst mit Aether und dann mit Methanol im Heissextraktor extrahiert. Am leichtesten wurden die braunen Schmieren herausgewaschen. Es empfiehlt sich, wenn die Schmieren durchgelaufen sind, sofort die Vorlage zu wechseln ; die weiteren Extrakte sind dann nur noch schwach gefärbt und leichter zu verarbeiten.

*Zone 1:* Der Aetherextrakt enthielt einen geringen, flockigen Niederschlag, der in Aether, Aceton, Chloroform sehr schwer, in Eisessig aber leichter löslich war. Sp. 90°-115° Negative L. B. R. Als die Extraktion mit Aether träge wurde, ersetzte ich diesen durch Methanol. (Bekanntlich zählen Methyl- und Aethylalkohol zu den wirksamsten Verdrängern.) Aus den Methanolextrakten gewann ich eine weisse, pulverige Masse mit starker L. B. R. Sp. 210°-235°. Es war *rohes Cerevisterin.* — Nach Abdampfen des Aethers und des Methanols hinterliessen mir die M. L. dunkelbraune Schmieren. Durch Digerieren mit wenig Aether, konnte ich aus diesen noch etwas *Cerevisterin* gewinnen.

*Zone 2:* Aus dieser Zone gewann ich *rohes Ergosterin.* Auch hier verblieben die M. L. als braune Schmieren. Die Extraktion mit Methanol brachte keine Sterine mehr heraus.

*Zone 3:* In dieser Zone fand ich das *sog. Fungisterin* mit seiner charakteristischen L. B. R. Der Sterinniederschlag, der zwischen 107° und 144° schmolz, wurde in der auf Seite 9 beschriebenen Weise gereinigt. *Ergosterin* war sehr wenig dabei. — Auch in dieser Zone überwogen die braunen Schmieren mengenmässig.

*Zone 4:* In dieser Zone, wie auch in den Benzoldurchläufen beim Entwickeln der Säule, befinden sich keine Sterine mehr. Aus den Extrakten konnte ich *Wachsalkohole* Sp. 63°-75° isolieren.

Den hochschmelzenden Niederschlag aus Zone (1) habe ich aus Aceton umkristallisiert. Ich erhielt schöne, winzige Nadeln von homogenem Aussehen. Braunfärbung bei 205°, Sp. 248°-250° unter Zersetzung. Es war *Cerevisterin.* s. S. 14.

Das *Roh-Ergosterin* aus Zone 2 und aus der Aetherextraktion des schleimigen Niederschlages (A) habe ich nach dem Dreieckschema umkristallisiert, in der Hoffnung die M. L. mit evtl. vorhandenem Fungisterin anzureichern. Das Resultat war negativ. Das *Ergosterin* habe ich auf den Sp. 158°-160° gebracht. Auf eine weitere Reinigung habe ich verzichtet.

# 2. Beschreibung der Versuche
mit
## Sog. Fungisterin.

**Verbrennung meines reinsten Produktes** (Sp. 154°-155°) :

3.945 mg Substanz (bei 100° i. Hochv. über $P_2O_5$getr.)
11.810 mg $CO_2$, 4.218 mg $H_2O$ ; Gefunden C = 81.65 % H = 11.96 %
3.982 mg Substanz (bei 125° i. Hochv. über $P_2O_5$getr. Subst. sublimiert)
11.914 mg $CO_2$, 4.246 mg $H_2O$ ; Gefunden C = 81.60 % H = 11.93 %

**Benzoat** : 10 mg *sog. Fungisterin* wurden in ½ ccm reinstes Pyridin gelöst. Die Lösung wurde mit zwei Tropfen Benzoylchlorid versetzt und kurz auf dem Dampfbad erhitzt. Nach zweistündigem Stehen in Eiswasser wurde Wasser zugegeben und filtriert, zweimal mit ClH und dann mit Wasser bis zum Verschwinden der Cl'-Reaktion gewaschen. Der Niederschlag wurde im Exsikkator scharf getrocknet und zweimal aus Methanol umkristallisiert. Sp. 179.5°-180.5°.

2.349 mg Substanz (bei 60° i. Hochv. über $P_2O_5$getrocknet) gaben
7.153 mg $CO_2$ und 2.193 mg $H_2O$. Gefunden C = 83.05 % H = 10.45 %
Für $C_{25}H_{41}O$. OC. $C_6H_5$ berechnet C = 83.05 % H = 10.03 %

**Hydrierung** : 20.7 mg *sog. Fungisterin* (Sp. 153°-154°), in 4 ccm Eisessig gelöst, wurden mit 20 mg $PtO_2$ am Mikrohydrierapparat hydriert. Nach vier Stunden wurde kein Wasserstoff mehr aufgenommen. — Zur Kontrolle wurde ein Parallelversuch mit einer entsprechenden Menge Cholesterin ausgeführt. Während das Cholesterin, wie erwartet, das einer Doppelbindung entsprechende Wasserstoffvolumen aufnahm, blieb beim *sog. Fungisterin* die Wasserstoffaufnahme weit unter diesem Stufenwert. Sie betrug nämlich 0.54 ccm gegenüber dem theoretischen Wert von 1.4 ccm für eine Doppelbindung berechnet.

4.007 mg Hydrierungsprodukt (bei 100° i. Hochv. über $P_2O_5$ getr.) gaben
12.004 mg $CO_2$ und 4.200 mg $H_2O$. Gefunden C = 81.70 % H = 11.73 %
Für unverändertes *sog. Fungisterin* berechnet C = 81.7 % H = 11.8 %

*Sog. Fungisterin* hat demnach keine hydrierbare Doppelbindung. Für die Wasserstoffaufnahme muss verunreinigendes Ergosterin verantwortlich gemacht werden.

**Drehung** : 18.6 mg *sog. Fungisterin* (Sp. 154°-155°) wurden in zwei ccm Chloroform gelöst und die Lösung in ein 0.997 dm langes Polarisationsrohr eingefüllt. a = — 0.23° $(a)_D^{18°}$ = — 0.24.8°

**Bromierung :** Einige *sog. Fungisterinbenzoat-Kristalle* wurden gerade in Eisessig gelöst und mit einigen Tropfen einer schnell bereiteten Brom-Eisessiglösung unter Kühlung versetzt. Die Lösung blieb kurze Zeit farblos, wurde dann auf einmal gelb, intensiv gelb und schliesslich grün. Mit Jodstärkepapier hatte ich mich vergewissert dass kein Ueberschuss an Brom war. — Ein mit Ergosterinbenzoat angestellter Parallelversuch blieb unter gleichen Bedingungen farblos.

**Farbreaktionen auf Doppelbindungen :**

*Baeyer'sche Probe:* ca. 1 mg Substanz wurde in stabilem Eisessig gelöst. Ein zugefügter Tropfen einer verdünnten Kaliumpermanganatlösung wurde sofort entfärbt.

*Tetranitromethan Probe:* ca. 1 mg Substanz wurde in Chloroform gelöst. Ein zugefügter Tropfen dieses Reagens gab eine Gelbfärbung. Unter gleichen Bedingungen färbt sich eine Ergosterinlösung braun.

**Liebermann-Burchard'sche Reaktion :** Einige *sog. Fungisterinkristalle* wurden gerade in Chloroform gelöst und mit 1 ccm Essigsäureanhydrid versetzt. Ein Tropfen konzentrierte Schwefelsäure bewirkt folgendes Farbenspiel : rasch rot, violett, dann ¼-½ Minute lang blau, dann über grünstichig allmählich in grün.

**Digitoninfällung :** Eine heisse alkoholische Lösung von ca. 60 mg *Roh-sog. Fungisterin* (Sp. 141°-146°) wurde mit 15 ccm einer heissen, 1 %igen Lösung von Digitonin in 90 %igem Alkohol versetzt. Das ausgefallene Digitonid wurde nach Erkalten abgenutscht, mit Aether und Alkohol gewaschen und dann in Pyridin gelöst. Durch Zugabe von Aether wurde das Digitonin gefällt. Nach Abdampfen des Pyridins im Vakuum, wurde das Sterin aus Methanol umkristallisiert. ca. 40 mg Federförmiger Kristalle. Sp. 148°-149° mit langer blauer L. B. R.

## Cerevisterin.

**Benzopersäuretitration nach Prileschajew :** 19 mg *Cerevisterin* (M = 430) wurden in 5 ccm einer 0.055 molaren Lösung von Benzopersäure in Chloroform gelöst und 36 Stunden lang im Eisschrank stehen gelassen. Die reine Säurelösung wurde unter den gleichen Bedingungen aufbewahrt.

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1 ccm der Säurelösung | verbrauchte | 1.10 | ccm 0.1 n $S_2O_3Na_2$ |
| 1 ccm der Sterin-Säure-Lösung | » | 0.95 | » » » |

19 mg Cerevisterin verbrauchen (5 × 0.15 × 0.055) 0.041 Millimol Säure
Für eine Doppelbindung berechnet man (19 : 430) 0.044 Millimol Säure.

**Verbrennung des Cerevisterinoxyds :**

3.708 mg Substanz, im Exsikkator getrocknet, ergaben : 9.375 mg $CO_2$ und 3.146 mg $H_2O$. Gefunden : C = 69.00 % H = 9.49 %.

Leider führt dieses Ergebnis zu keinem Schluss. Der ausserordentlich hohe Sauerstoffgehalt (O = 21.5 %) kann nur durch noch anhaftendes Wasser erklärt werden. Am wenigsten schlecht würden die für die Formel $C_{28}H_{46}O_4 \cdot 2\frac{1}{2} H_2O$ errechneten Werte :

C = 68.5 % H = 10.4 % O = 21.2 % übereinstimmen.

**Hydrierung :** 19 mg *Cerevisterin*, in 4 ccm Eisessig gelöst, wurden mit 20 mg $PtO_2$ am Mikrohydrierapparat hydriert. In fünf Stunden wurde kein Wasserstoff aufgenommen.

**Farbreaktionen auf Doppelbindungen :**

*Baeyer'sche Probe:* ca. 1 mg *Cerevisterin* wurde in stabilem Eisessig gelöst. Ein zugefügter Tropfen einer verdünnten Kaliumpermanganatlösung wurde nicht entfärbt.

*Tetranitromethan Probe:* ca. 1 mg *Cerevisterin* wurde in Chloroform gelöst. Ein zugefügter Tropfen Tetranitromethan gab keine Braunfärbung.

*Rosenheim'sche Reaktion*[24]*:* ca. 1 mg *Cerevisterin* wurde in Chloroform gelöst. Beim Zugeben eines Tropfens einer 90 %igen, wässerigen Trichloressigsäure-Lösung färbte sich die Lösung intensiv rot, dann schmutzig-grün und schliesslich oliv-grün.

**Vergleich meines Produktes mit Cerevisterin von H. u. B. :** Beide Produkte färben sich bei 240° braun und schmelzen zwischen 247° und 250°. Der Mischschmelzpunkt gab keine Depression. Die Farbreaktionen sind identisch. Bei der L. B. R. tritt eine charakteristische scharlachrote Farbe auf, die dann rasch über violett, blau in grün überschlägt.

## X - Körper.

**Vakuumdestillation :** 40 mg Substanz wurden im Hochv. (0.001 mm Hg) destilliert. Zwischen 190° und 205° gingen klare, dickflüssige Tröpfchen über. Aus Methanol umkristallisiert, bildeten sie schöne Blättchen. Sp. 81°-82°. Negative L. B. R.

**Molekulargewichtsbestimmung nach Rast :** 0.244 mg Substanz in 2.423 mg Kampher gelöst ergaben eine Depression von 9.8°. K = 37.45°. M = 385.

**Verbrennung :**

3.846 mg Substanz (bei Z. T. über $P_2O_5$getr.) gaben 11.015 mg $CO_2$ und 4.584 mg $H_2O$.
Gefunden : C = 78.11 % H = 13.34 %.

**Farbreaktionen auf Doppelbindungen :**

*Baeyer'sche Probe:* ca. 1 mg Substanz wurde in stabilem Eisessig gelöst. Ein zugefügter Tropfen einer verdünnten Kaliumpermanganatlösung wurde nicht entfärbt.

*Tetranitromethan Probe:* ca. 1 mg Substanz wurde in Chloroform gelöst. Ein zugefügter Tropfen dieses Reagens gab keine Braunfärbung.

**Probe auf sauren Charakter :** ca. 10 mg Substanz wurden heiss in Alkohol gelöst und mit einem Ueberschuss Natronlauge versetzt. Erhitzt und nach Erkalten mit Aether ausgeschüttelt. Die Substanz fand sich im Aetherextrakt wieder.

---

# SCHRIFTTUM

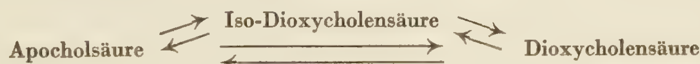
1. ULRICH WIELAND, Dissertation Universität, München 1937.
2. HARTMANN u. ZELLNER, Mh. Chem. **50**, 193 (1928).
3. LETTRÉ u. INHOFFEN, « Ueber Sterine, Gallensäuren und verwandte Naturstoffe », Stuttgart 1936.
4. BIRKINSHAW, Biochemical J. **25**, 1927 (1931).
MASSENGALE, BILLS u. PRICKETT, J. biol. Chemistry **94**, 213 (1931).
ROSENHEIM, J. Soc. Chem. Ind. **51**, 464 (1932).
5. KNAUER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **176**, 151 (1928).
HALDEN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **234**, 1 (1935) ; **225**, 249 (1934). Naturw. **21**, 660 (1934).
6. SCHÖNHEIMER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **180**, 1 (1929).
BEUMER u. FASOLD, Biochem. Z. **259**, 471 (1933).
DAM u. STARUP, Biochem. Z. **274**, 117 (1934).
7. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 180, 32 (1929). WINDAUS, Arch. Pharmaz. **246**, 121 (1908).
8. TANRET, C. r. Acad. d. Sc. **108**, 98 (1889). Ann. Chim. Phys. **20**, 289 (1890).
9. SMEDLEY u. MACLEAN, Biochemical J. **22**, 22 (1928).
REINDEL u. WEIKMANN, Liebig's Ann. Chem. **482**, 120 (1930).
WIELAND u. DANE, Liebig's Ann. Chem. **530**, 144 (1937).
10. Von WIELAND und STANLEY entdeckt.
11. WIELAND u. Mitarbeiter, Liebig's Ann. Chem. **473**, 300 (1929); **482**, 36 (1930).
12. TANRET, C. r. Acad. d. Sc. **147**, 76 (1908). Ann. Chim. Phys. VIII, XV, 313 (1908).
13. ZELLNER u. ZIKMUNDA, Mh. Chem. **56**, 200 (1930).
14. ZECHMEISTER u. CHOLNOKY, « Die chromatographische Adsorptions-Methode », Wien 1937 s. S. 76 u. f.
15. Sitosterin aus Roggen- und Weizenkeimlingen gibt auch eine blaue L.B.R. Nur ist hier dunkelblau, resp. dunkelviolett die Schlussfarbe. Vgl. :
GLOYER u. SCHUETTE, J. Amer. chem. Soc. **61**, 1901 (1939).
BERNSTEIN u. WALLIS, J. Amer. chem. Soc. **61**, 1903 (1939).
16. HONEYWELL u. BILLS, J. biol. Chemistry **99**, 71 (1932) ; **103**, 515 (1935).
17. SCHÖNHEIMER u. EVANS, J. biol. Chemistry **114**, 567 (1936).
18. THOMS, Ber. dtsch. chem. Ges. **29**, 2985 (1896) ; Arch. Pharmaz. **235**, 28 (1897).
19. BICKERN, Arch. Pharmaz. **241**, 166 (1903).
20. KLOBB, C. r. Acad. d. Sc. **138**, 763 (1904) ; **140**, 1700 (1905) ; Bull. Soc. chim., série 3, **33**, 1075 (1905).
21. KLOBB, C. r. Acad. d. Sc. **149**, 999 (1909).
22. REINDEL, Liebig's Ann. Chem. **480**, 76 (1930).
23. HEILBRON, c. s. J. chem. Soc. **1928**, 48.
24. ROSENHEIM, Biochemical J. **23**, 47 (1929).

# Ueber
# 3,12-Iso-Dioxy-cholensäure
## und
# 3,12-Dioxy-choladiensäure

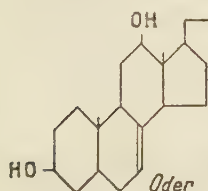
---

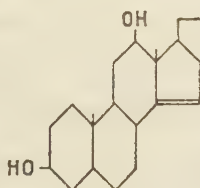
In dieser Arbeit habe ich es versucht die Darstellung von *3-12-Iso-Dioxycholensäure* aus *Apocholsäure* zu verbessern. Ferner wollte ich die von H. Wieland und H. Ottawa [1] gefundene neue *Diensäure* weiter untersuchen.

F. Boedecker [2] hat im Jahre 1920 gefunden, dass bei der Dehydratisierung von *Cholsäure* ein Gemisch von *Apocholsäure* und *Dioxycholensäure* entsteht. Im Jahre 1933 fand K. Yamasaki [3] ein drittes Isomeres, nämlich die *Iso-Dioxycholensäure.* Auf Grund seiner weiteren Untersuchungen hat er im Jahre 1935 [4] gezeigt, dass sich diese isomeren Säuren gegenseitig ineinander überführen lassen. Allem Anschein nach stehen sie miteinander im Gleichgewicht:

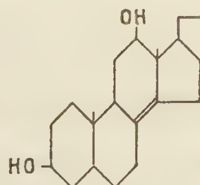



Ueber die Konstitution dieser drei *dehydratisierten Cholsäuren* weiss man noch nichts Bestimmtes. Vorläufig werden folgende Strukturformeln vorgeschlagen :




Formel I




Formel II

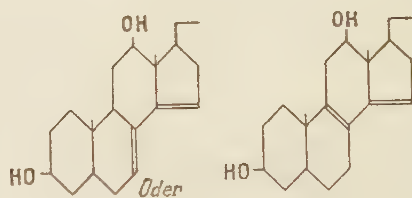
Formel III

*Formel I* für *Dioxycholensäure*, weil diese sich katalytisch zu *Desoxycholsäure* hydrieren lässt, und bei der Oxydation Aufspaltung der Doppelbindung zu Carbonyl und Carboxyl erfolgt.

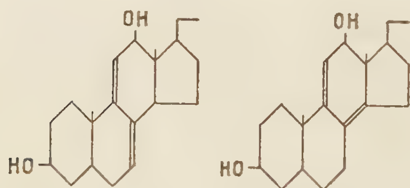
*Formel II* für *Apocholsäure*, weil diese Säure katalytisch nicht hydrierbar ist. Dies würde für eine Doppelbindung zwischen zwei tertiären C-Atomen sprechen. — Die *Diensäure* (Formel IV) lässt sich durch Hydrierung wieder in *Apocholsäure* überführen, allerdings auch unter Bildung von *β-Apocholsäure*, der am C-Atom 9 epimeren Säure.

*Formel III* für *Iso-Dioxycholensäure*, weil diese katalytisch nicht hydrierbar ist.

Sämtliche drei Säuren geben kein Dibromid. Nach primärer Anlagerung von Brom und darauffolgender Bromwasserstoff-Abspaltung bilden sich doppelt ungesättigte Säuren. — Für die *Diensäuren* aus *Apochol-* und *Dioxycholensäure* sind nebenstehende Formeln IV wahrscheinlich. Von der *Diensäure* aus *Iso-Dioxycholensäure* dagegen kann man sich noch kein annäherndes Bild machen. Auf Grund des Fehlens des für konjugierte Doppel-Bindungen charakteristischen Maximums bei ca. 240 mμ im Absorptionsspektrum, sind nebenstehende Formeln, die einem sofort in den Sinn kommen, ausgeschlossen.



Formel IV




Jede weitere Erkenntnis über diese neue *Diensäure* würde uns mehr Einsicht in die Natur, nicht nur der *Iso-Dioxycholensäure*, von der sie sich ableitet, sondern auch der *Apochol-* und der *Dioxycholensäure*, gewähren.

Leider wurde diese Arbeit durch die ausserordentlich geringen Ausbeuten und die Kristallisationsschwierigkeiten stark behindert.

## Iso-Dioxycholensäure aus Apocholsäure.

Ich habe das Verfahren von Yamasaki angewandt das darin besteht, *Apocholsäure* mit konzentrierter Salzsäure zu isomerisieren. Ich muss gleich erwähnen dass die Resultate, trotz gleicher Versuchsbedingungen,

sehr unregelmässig ausfallen und dass eine Ausbeute von 9 % ein Maximum und eher eine Ausnahme ist. Ferner haben sich kleine Ansätze besser bewährt als grosse.

*Methode von Yamasaki:* Eine Lösung von 4 gr *Apocholsäure* in 15 ccm Eisessig wird bei Zimmertemperatur und unter Luftausschluss ($CO_2$) unter Schütteln, allmählich mit 24 ccm ClH (d 1.2) versetzt. Die Lösung färbt sich braunrot. Nach 1 ½ Stunden, wenn Trübung eingetreten ist, wird der Kolbeninhalt in kaltes Wasser gegossen und mit Soda schwach kongesauer gemacht. Der Niederschlag wird dann mit 5 %iger Kalilauge eine Stunde lang auf dem Wasserbad verseift. Nach Erkalten wird die Lösung neutralisiert und die ausgefallene Masse abgesaugt und scharf getrocknet. — Die trockene Substanz bleibt dann mit der 1 ½ fachen Menge Aether über Nacht stehen. In Lösung gehen harzige Zersetzungsprodukte, die einen Teil der Säuren mitführen (a) ; der Bodensatz besteht aus Säuren. Das Aetherunlösliche wird mit der 2 fachen Menge absoluten Alkohol digeriert. Hierbei geht *Apocholsäure* in Lösung. Durch öfteres Umkristallisieren des Rückstandes aus Essigester und aus verdünntem Alkohol gewinnt man *Iso-Dioxycholensäure* Sp. 196°-197°.

*Erhöhung der Ausbeute:* Von meinen zahlreichen Versuchen, die Ausbeute zu verbessern, erwähne ich nur die Behandlung der Aetherlösung (a) mit 20 %iger ClH, die eine Erhöhung der Ausbeute um ca. 15-20 % ermöglicht. — 40 gr *Apocholsäure* wurden nach Yamasaki verarbeitet und gaben 1.66 gr *Iso-Dioxycholensäure* Sp. 194.5°-195.5° als alkoholunlöslichen Rückstand. — Die verbleibende Aether-Mutterlauge (a) wurde 4 Mal mit je 200 ccm 20 %iger, aethergesättigter ClH ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden zur Hälfte mit Soda neutralisiert und 4 Mal mit Aether extrahiert. Die Auszüge wurden getrocknet, eingeengt und stehen gelassen. Aus dem gebildeten Niederschlag (Sp. 179°-181°) konnte ich durch Umkristallisieren aus Essigester 0.30 gr *Iso-Säure* Sp. 193°-195° gewinnen. — Ich versuchte noch die M. L. (a), nach ihrer Behandlung mit ClH, mit Lauge auszuschütteln. Ich verwendete 6 Mal je 40 ccm n/5 NaOH. Aus den zwei ersten Extrakten erhielt ich einen Niederschlag vom Sp. 159°-161° ; es war unreine *Apocholsäure.* — Die *Iso-Säure* war bereits quantitativ durch die ClH extrahiert worden.

### Diensäure nach H. Ottawa u. E. Dietz, durch Einwirkung von Brom auf Iso-Dioxycholensäure.

Eine Lösung von 1 gr *Iso-Dioxycholensäure* und 1 gr trockenem Natriumacetat in 1 ccm reinem Methanol wurde innerhalb 15 Minuten unter starker Kühlung, tropfenweise mit 3.72 ccm einer 1.5 n methyl-

alkoholischen Bromlösung versetzt, bis zu anhaltender schwacher Gelbfärbung. Die Lösung wurde in eiskaltes Wasser gegossen, die Fällung abgesaugt und in reinem Aether gelöst. Hierauf wurde mehrmals mit Soda ausgezogen. Die vereinigten Auszüge wurden angesäuert und die ausgefallene Säure wieder in Aether aufgenommen. Die Aetherlösung war gelblich gefärbt. Aus dieser erhielt ich, nach Trocknen über $CaCl_2$ und Einengen, einen Niederschlag von 0.22 gr Sp. 154°-155° der, aus Essigester umkristallisiert, 0.14 gr *Diensäure* Sp. 161°-163° gab.
*Bemerkung :* Auch hier führen nicht alle Bromierungen zu kristallisierter Diensäure. Trotz gleicher Versuchsbedingungen, erhält man oft nur braune Schmieren die allerdings mit 30 %iger ClH die charakteristische Halochromieerscheinung der Diensäure geben.
*Halochromie :* Der Versuch erfolgt aus aetherischer Lösung. 0.1 gr *Dioxycholadiensäure* wird in 2 ccm Methanol gelöst, die Lösung in 200 ccm reinem Aether gegossen und aus der Mischung der Alkohol mit Wasser herausgewaschen. Versetzt man nun die farblose Lösung mit 40 ccm eiskalter, aethergesättigter 30 %iger ClH und schüttelt einige Minuten lang, so färbt sich der Extrakt intensiv violett. (Nach drei Extraktionen verbleibt in der Aetherphase keine Substanz mehr.) Die Halochromie kann wieder rückgängig gemacht werden, wenn man den Extrakt mit frischem Aether durchschüttelt und unter Aether mit Eiswasser verdünnt. Es ist aber nicht gelungen die eingesetzte Säure wieder zu gewinnen ; man erhält amorphe Umwandlungsprodukte, die wieder violette Salzlösungen geben.

### Versuch die Diensäure mit Natrium zu hydrieren.

140 mg *Diensäure* wurden in einem mit Rückflusskühler versehenen Kölbchen in 40 ccm absolutem Alkohol gelöst und auf 50° erhitzt. In nicht zu langsamen Tempo wurden 5 gr, in Stückchen zerschnittenes und unter trockenem Aether aufbewahrtes Natrium zugegeben. Als alles Natrium verbraucht war, wurde das erkaltete Reaktionsgemisch in kaltes Wasser gegossen und mit ClH sauer gemacht. Die ausgefallene Säure wurde in Aether aufgenommen, die Lösung getrocknet und eingeengt. — Ich erhielt eine hellbraune Schmiere. Meine Versuche, aus ihr durch Digerieren mit Alkohol, Essigester, Aceton, eine Kristallisation zu bekommen, blieben erfolglos.

### Oxydation der Iso-Dioxycholensäure mit Benzopersäure.

Eine Lösung von 200 mg *Iso-Säure* in 3 ccm stabilem Eisessig wurde mit einem 4.7 fachen Ueberschuss einer 0.08n Benzopersäurelösung in Chloroform versetzt und über Nacht im Eisschrank stehen gelassen.

(Durch Titration der unveränderten Persäure im Reaktionsgemisch konnte ich eine, der Oxydierung einer Doppelbindung entsprechende Konzentrationsabnahme feststellen.) — Die überschüssige Persäure wurde mit $SO_2$ zerstört und die Lösung im Vakuum vom Chloroform befreit. Der Rückstand wurde in Aether aufgenommen (hellbraune Lösung) und 5 Mal mit je 10 ccm einer gesättigten Bicarbonatlösung fraktioniert extrahiert. In der 5. Fraktion war keine Benzoesäure mehr enthalten. Zum Schluss extrahierte ich noch 3 Mal mit je 10 ccm 2n Sodalösung, worauf die Aetherphase erschöpft war. Die Auszüge wurden angesäuert und die ausgefallenen Säuren in Aether aufgenommen. Der Aether wurde abgedampft und der Rückstand der ersten 4 Auszüge mit heissem Wasser behandelt und heiss filtriert. Auf diese Weise wurde die Benzoesäure herausgewaschen. Als Rückstand verblieb eine braune, amorphe Masse. — Die sauren Bestandteile der 4 letzten Auszüge wurden zusammengetan, getrocknet und mit Aether digeriert. Es kam zu keiner Kristallisation ; ebenso erfolglos blieb die Behandlung mit Essigester. Die erhaltenen Schmieren sahen denjenigen sehr ähnlich, die man oft bei der Bromierung der Iso-Säure erhält. Auch sie gaben, in Aether gelöst, mit 30 %iger ClH die für die Diensäure charakteristische Halochromie ; die salzsäure Lösung war violett gefärbt.

## Zusammenfassung.

Durch Extraktion mit 20 %iger ClH ist es möglich die Ausbeute an *Iso-Dioxycholensäure* aus *Apocholsäure* um 15-20 % zu verbessern.

Die Hydrierung der *Diensäure* mit Natrium und Alkohol führte zu keinem kristallisierten Produkt, sodass aus ihr keine Schlüsse gezogen werden können. — Die Frage, ob sich dabei *Iso-Dioxycholensäure* zurückbildet, bleibt noch offen. Erwähnt sei dass auch Hydrierungsversuche von H. O. u. E. D. mit $PtO_2$ kein eindeutiges Ergebnis gezeitigt haben.

Die Oxydation der *Iso-Dioxycholensäure* mit Benzopersäure führte zu keiner kristallisierten Säure, doch gab das amorphe Produkt mit 30 %iger ClH eine violette Salzlösung, wie die Diensäure. — Prinzipiell sollte man durch Oxydation der *Iso-Säure* zu dem gleichen Produkt gelangen, wie man es durch Bromierung dieser Säure erhält, nämlich zur *Diensäure*. Der primär angelagerte Sauerstoff muss aus den gleichen sterischen Gründen wieder als Wasser abgespalten werden, die bei der Bromierung das angelagerte Brom in Form von BrH abstossen.

# SCHRIFTTUM

1. H. Wieland, E. Dietz u. H. Ottawa, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **244**, 194 (1936).
2. F. Boedecker, Ber. chem. Ges. **53**, 1852 (1920) ; **54**, 2489 (1921).
3. K. Yamasaki, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **220**, 42 (1933).
4. K. Yamasaki, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **233**, 10 (1935).
5. H. Wieland u. E. Dane, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **206**, 243 (1932) ; **212**, 263 (1932).
6. R. K. Callow, J. Chem. Soc. **1936**, 462.